

Sulfanomiden in dierlijke produkten.

Lab. 21 Contaminanten

Verslag 80.11

pr.nr. 7.384

1980-05-19

Lab. 21 Contaminanten

pr.nr. 7.384

Verslag 80.11

1980-05-19

Project: Ontwikkeling van methoden voor het aantonen en bepalen van
diergeneesmiddelen.

Onderwerp: Sulfonamiden in dierlijke produkten.


Voorgaande verslag: pr.nr. 7.384 d.d. 1979-06-20.

Doel:

Het ontwikkelen van een multi-detektiemethode voor sulfonamiden in dierlijke produkten m.b.v. H.P.L.C.

Konklusie:

De beschreven methode in bijlage 1 zou goed bruikbaar zijn, de recoveries voor blanco + toevoeging en monster + toevoeging zijn 74% en 60%, wanneer de interferentie met dezelfde retentie als sulfadimidine in het chromatogram ondervangen kan worden. Een breder onderzoek naar de mogelijkheden voor de toepassingen van fluorescamine en de opwerkingsmethode van Carl. W. Sigel et al. zou perspectieven kunnen opleveren. Het toepassen van ion-pair vloeistofchromatografie, met een alkylsulfonzuur als counter-ion in een gebufferd milieu, zou de retentietijden van interferenties en sulfonamiden veranderen.

Verantwoordelijk: ir L.G.M.Th. Tuinstra. 

Medewerkers : G. van Bruchem, W.A. Traag.  

1. Inleiding:

Sulfonamiden worden toegevoegd aan veevoeders voor de bestrijding van bacteriële infecties. De meest toegepaste sulfonamide is sulfadimidine (tabel 1). Via het slachtdier kunnen residuen van sulfonamiden terecht komen in produkten bestemd voor menselijke konsumptie. In Nederland zijn residue toleranties voor sulfonamiden in vlees en vleesprodukten niet bekend, hoewel er in Amerika een residue tolerantie gehanteerd wordt van 0,1 mg/kg. Vanuit volksgezondheidsoverwegingen is het noodzakelijk er voor te zorgen dat produkten van dierlijke oorsprong geen (ontoelaatbare) gehalten aan sulfonamiden bevatten. Gezien de grote verscheidenheid aan sulfonamiden, welke in principe therapeutische toepassingsmogelijkheden hebben en aan de andere kant de onbekendheid met de samenstelling, uit het oogpunt van de verschillende sulfonamiden en hun concentraties, van het veevoeder is het absoluut noodzakelijk een multi-detektiemethode voor sulfonamiden beschikbaar te hebben op een niveau van 0,01 - 0,05 mg/kg op produkt basis.

2. Werkmethode

2.1. Apparatuur en hulpmiddelen:

Zie bijlage 1.

2.2. Reagentia en Chemicalien:

Zie bijlage 1.

3. Experimenten en Resultaten:

Er is begonnen met een literatuuronderzoek op het gebied van de bepaling van sulfonamiden in dierlijke produkten.

Tot de konklusie is men in dit onderzoek (verslag 1979-06-20) gekomen dat men in eerste instantie de methode van het R.I.V. (rapport no. 169/78 LCL0) zal naverken. Als eerste is er onderzocht bij welke verhouding van water-methanol de k' -waarden van de sulfonamiden zoveel mogelijk verschilden. Bij een verhouding van water-methanol 85:15 zijn drie verschillende mengsels van sulfonamiden samengesteld, één mengsel van 5 sulfonamiden, één van 4 sulfonamiden en één van 3 sulfonamiden (tabel 2). Het naverken van de R.I.V. methode (1) is verder enkel uitgevoerd voor de meest toegepaste sulfonamide namelijk sulfadimidine. De recovery voor een blanco + toevoeging (10.000 ng) was 18% dit in tegenstelling met het R.I.V. resultaat (60 - 90% recovery). Dit verschil zou te wijten kunnen zijn aan het feit dat wij een andere eluenssamenstelling en residue-oplosmiddel gebruiken in vergelijking met de R.I.V.-methode, maar uit een gedetailleerd onderzoek bleken er grote verliezen op te treden in de verschillende opwerkingsstappen (tabel 3).

Het grootste verlies werd veroorzaakt door een niet optimale pH tijdens het uitschudden met dichloormethaan. Door het uitschudden met dichloormethaan nog 2 keer te herhalen en door de optimale pH eerst te bepalen, en daarna te gebruiken, is in deze ene stap de maximale recovery bij pH 5,5 80% en werd de recovery voor blanco + toevoeging in de totale werkwijze verhoogd tot 30%.

Na overleg met dhr. Vaessen van het R.I.V. is besloten de toegevoegde hoeveelheid sulfadimidine (10.000 ng) te halveren.

Hierdoor werden de recoveries voor blanco + toevoeging en voor monster + toevoeging respectievelijk 74% en 60% (chrom. 1,2 en 3).

Het indampresidue was opgelost in methanol en dit gaf een slechte recovery (chrom 2); door zoutzuur toe te voegen werd de recovery verbeterd (60% en 74%). De poging om de recovery nog meer te verhogen door azijnzuur i.p.v. zoutzuur aan het residue toe te voegen leverde geen verandering op.

Na verlaging van de toevoeging bleek de optimale pH voor het uitschudden 6,5 te zijn (tabel 4). Dit verschil is niet goed te verklaren.

De uiteindelijke door ons voorgestelde methode voor de bepaling van sulfadimidine in vleesprodukten is beschreven in bijlage 1.

Alle verdere uitgevoerde bepalingen ter verbetering van de recovery van sulfadimidine in vleesprodukten leverden een interferentiepiek op die dezelfde retentie had als sulfadimidine, ook was het niet meer mogelijk met de methode, beschreven in bijlage 1, te werken zonder deze interferentie. Een oplossing om deze interferentiepiek te ondervangen werd niet gevonden. Hierna is een onderzoek gestart naar de bepaling van sulfadimidine in vleesprodukten m.b.v. dunnelaagchromatografie en fluorescentiedetectie (1). Als fluorescentiederivaat is fluorescamine gekozen omdat fluorescamine zelf niet fluoresceert maar wel in combinatie met primaire aminen zoals sulfadimidine.

Op de silicagelplaat werd gebracht:

- a) sulfadimidine,
- b) fluorescamine,
- c) triëthanolamine,
- d) een mengsel van fluorescamine en triëthanolamine,
- e) een mengsel van sulfadimidine, fluorescamine en triëthanolamine.

(1) Carl W. Sigel, Joseph L. Woolley jr., Charles A. Nichol, J. of Pharm. Sci., vol 64, no. 6, june 1975, 973-976.

Alleen het mengsel van sulfadimidine, fluorescamine en triëthanolamine was goed waarneembaar met U.V.-licht. Wanneer het mengsel van deze 3 verbindingen op de plaat wordt gebracht dan is diëthylether door C.W. Sigel gebruikt als loopmiddel niet polair genoeg en moet er azijnzuur toegevoegd worden.

Bij een mengsel van diëthylether-ijsazijn (9:1) is de Rf-waarde 0,6 voor het complex van sulfadimidine en fluorescamine en de detectiegrens 2 ng. Het U.V. - spectrum van het complex met triëthanolamine opgelost in methanol geeft geen maximum.

Mogelijke oorzaak hiervan zou de pH kunnen zijn. Een nader onderzoek in deze zou aanbevelingswaardig zijn.

Konklusie:

De beschreven methode in bijlage 1 zou goed bruikbaar zijn, de recoveries voor blanco + toevoeging en monster + toevoeging zijn 74% en 60%, wanneer de interferentie met dezelfde retentie als sulfadimidine in het chromatogram ondervangen kan worden. Een breder onderzoek naar de mogelijkheden voor de toepassingen van fluorescamine en de opwerkingsmethode van Carl. W. Sigel et al. zou perspectieven kunnen opleveren. Het toepassen van ion-pair vloeistofchromatografie, met een alkylsulfonzuur als counter-ion in een gebufferd milieu, zou de retentietijden van interferenties en sulfonamiden veranderen.

Tabel 1.

Struktuur en fysische eigenschappen.

Sulfonamiden	Struktuurformule		pKa	Oplosbaar in	Smeltpunt
sulfanilamide	H ₂ N-	-SO ₂ NH ₂	10,4	H ₂ O, C ₂ H ₅ OH	165 °C
sulfapyridine	H ₂ N-	-SO ₂ NH	8,4	H ₂ O, C ₂ H ₅ OH	191 °C
sulfadiazine	H ₂ N-	-SO ₂ NH	6,4	H ₂ O, C ₂ H ₅ OH	255 °C
sulfadimethoxine	H ₂ N-	-SO ₂ NH	6,0		
sulfachinoxaline	H ₂ N-	-SO ₂ NH	6,5	H ₂ O, C ₂ H ₅ OH	247 °C
sulfamerazine	H ₂ N-	-SO ₂ NH	6,9	H ₂ O, C ₂ H ₅ OH	234 °C
sulfathiazol	H ₂ N-	-SO ₂ NH	7,2	H ₂ O, C ₂ H ₅ OH	202; 175 °C
sulfadimidine	H ₂ N-	-SO ₂ NH	7,6	H ₂ O	198 °C
sulfadimidine-Na	H ₂ N-	-SO ₂ -			
sulfamethoxydiazine	H ₂ N-	-SO ₂ NH-			
sulfacetamide	H ₂ N-	-SO ₂ NH-CO-CH ₃	5,4	H ₂ O, C ₂ H ₅ OH	182 °C
sulfaguanidine	H ₂ N-	-SO ₂ NH-C		H ₂ O, C ₂ H ₅ OH	190 °C

Tabel 2

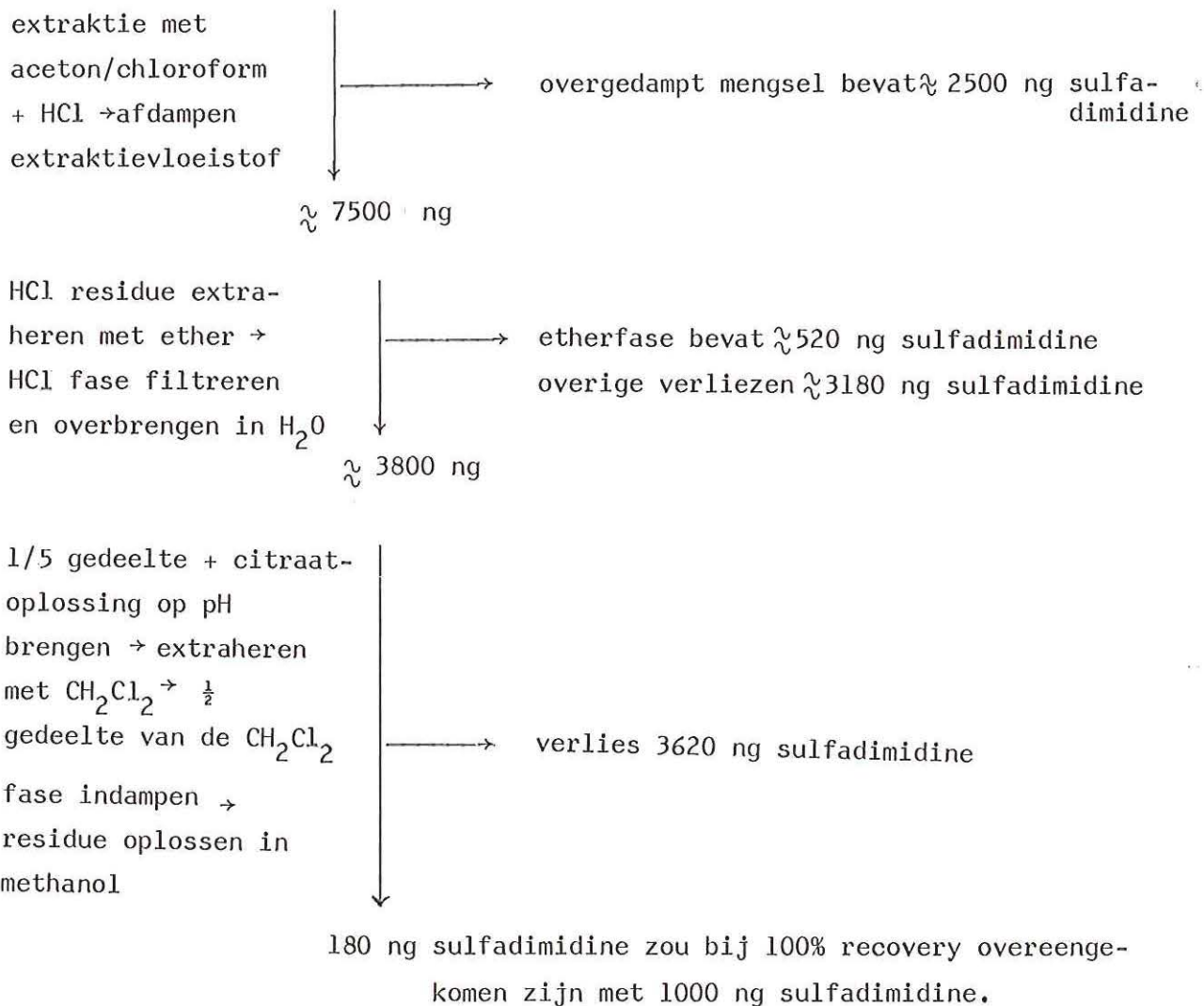
Retentietijden van sulfonamiden in water-methanol 85:15 mengsel.

<u>Sulfonamide</u>	<u>Retentietijd in sec.</u>
sulfanilamide	115
sulfapyridine	217
sulfadimethoxine	1350
sulfadimidine-Na	292
sulfadiazine	168
sulfachinoline	1266
sulfamerazine	231
sulfadimidine	312
sulfacetamide	117
sulfathiazol	1752
sulfamethoxydiazine	261
sulfaguanidine	112

Tabel 3

Overzicht van de verliezen in de diverse opwerkingsstappen.

10.000 ng sulfadimidine in methanol



Tabel 4

Overzicht van de recoveries van sulfadimidine in de laatste opwerkings-
stap door variaties van de pH.

de toevoeging was 5000 ng

pH	opbrengst na 1x uitschudden met CH ₂ Cl ₂	opbrengst na 2x	opbrengst na 3x	totaal	recovery
2,0	834 ng	767 ng	282 ng	1883 ng	38%
4,5	3304 ng	983 ng	207 ng	4494 ng	90%
5,0	3171 ng	850 ng	170 ng	4191 ng	84%
5	3281 ng	927 ng	109 ng	4317 ng	86%
6,0	3684 ng	915 ng	103 ng	4702 ng	94%
6,5	4102 ng	884 ng	103 ng	5089 ng	102%
8,4	1008 ng	1225 ng	699 ng	2932 ng	59%

De bepaling van sulfadimidine in luncheon-meat m.b.v. H.P.L.C.

1. Principe:

Het monster wordt in een mengsel van chloroform en aceton (1.1) gesuspenderd en vervolgens gefiltreerd. Door selectieve extractie met verschillende oplosmiddelen wordt sulfadimidine van het vet en andere mee-geëxtraheerde bestanddelen gescheiden en vervolgens met vloeistofchromatografie bepaald.

2. Apparatuur en hulpmiddelen

- 2.1. vloeistofchromatograaf, ACS
- 2.2. injectiekraan, Valco en voorzien van een loop van 20 µl
- 2.3. U.V.-detektor, Pye Unicam, golflengte 270 nm
- 2.4. recorder
- 2.5. R.V.S.-kolom, lengte 15 cm, inwendige diameter 4,6 mm
- 2.6. frits 2 µm
- 2.7. Waring-Blendor
- 2.8. rotorvapor
- 2.9. pH-meter

3. Reagentia en chemicaliën

Alle reagentia en chemicaliën dienen van een analytisch zo zuiver mogelijke kwaliteit te zijn.

- 3.1. aceton
- 3.2. chloroform
- 3.3. Dichloormethaan
- 3.4. diëthylether
- 3.5. methanol
- 3.6. water
- 3.7. zoutzuur, 5 mol/l
- 3.8. natriumhydroxide, 4 mol/l
- 3.9. natriumcitraatoplossing, verzadigd
- 3.10. natriumsulfaat, watervrij
- 3.11. sulfonamiden: stam oplossingen 100 µg/ml: standaardoplossingen: 500 ng/ml
- 3.12. elutievloeistof: water/methanol 85:15
- 3.13. pakkingsmateriaal: Lichrosorb 10 RP-18

4. Extraktie:

- meng 50 g vlees met 100 ml aceton/chloroform (1.1) in een Waring-Blendor.
- voeg hieraan eventueel 5000 ng sulfadimidinestandaard in methanol.
- suspendeer 30 sec. bij lage snelheid en 1 min. bij hoge snelheid.
- filtreer de organische fase over een vouwfilter in een rondbodemkolf van 1000 ml.
- breng de suspensie opnieuw in de W-B beker terug en voeg opnieuw 100 ml aceton/chloroform toe
- suspendeer weer zoals hierboven vermeld en herhaal dit nog één keer
- voeg aan de organische fase in de rondbodemkolf 5 ml zoutzuur (5N) toe
- damp de organische fase af bij 20 °C m.b.v. een rotorvapor
- breng het residue kwantitatief over in een scheitrechter van 250 ml met 4 x 25 ml diëthylether
- schud 30 sec. en laat de fasen scheiden gedurende 1 uur
- filtreer de zoutzure fase door een vouwfilter en vang het filtraat op in een maatkolf van 50 ml.
- spoel het filter 2x na met 5 ml water
- voeg aan de diëthyletherfase opnieuw 5 ml zoutzuur (5N) toe en herhaal bovenvermelde 3 stappen nog 2 keer
- vul de maatkolf aan met water tot de streep
- pipetteer 10 ml van deze oplossing in een bekerglas van 100 ml.
- voeg 50 ml van een verzadigde natriumcitraatoplossing toe
- breng de pH op 6,5 met natriumhydroxyde (4N) of met zoutzuur (5N)
- breng deze oplossing kwantitatief over in een scheitrechter van 250 ml.
- spoel het bekerglas na met 2 x 5 ml water
- voeg 20 ml dichloormethaan toe
- schud 2 min. en laat de fasen scheiden.
- filtreer de dichloormethaanfase over een trechter gevuld met natriumsulfaat in een platbodemkolf van 100 ml en spoel de natriumsulfaat 2x na met 5 ml dichloormethaan
- herhaal de stappen van af: voeg 20 ml dichloormethaan toe, nog 2 keer
- damp de dichloormethaan af bij 20 °C m.b.v. een rotorvapor
- los het residue op in 1 ml methanol + 2% zoutzuur (5N).

Chromatografie:

H.P.L.C. kondities: flow: 1,0 ml/min

kolom: 15 cm R.V.S. inw. diameter 4,6 mm

pakkingsmateriaal: Lichrosorb 10 RP-18

eluens: water-methanol 85:15

loop: 20 µl

gevoeligheid detector: 0.005 aufs

golflengte detector: 270 nm

gevoeligheid rekorder: 10 mV

papiersnelheid rekorder: 1 cm/min

- injecteer 20 µl van de standaardoplossing (500 ng/ml) en bereken het piekoppervlak
- injecteer 20 µl van het monster opgelost in 1 ml methanol + 2% zoutzuur (5N).

Berekening:

Bereken het sulfadimidine gehalte van het monster in mg/kg m.b.v. de formule:

$$\text{gehalte sulfadimidine in mg/kg} = \frac{O_m}{O_s} \times \frac{C_s}{100}$$

waarin:

O_m = het oppervlak van de sulfadimidine piek van het monster

O_s = het oppervlak van de sulfadimidine piek van de geïnjecteerde standaardoplossing

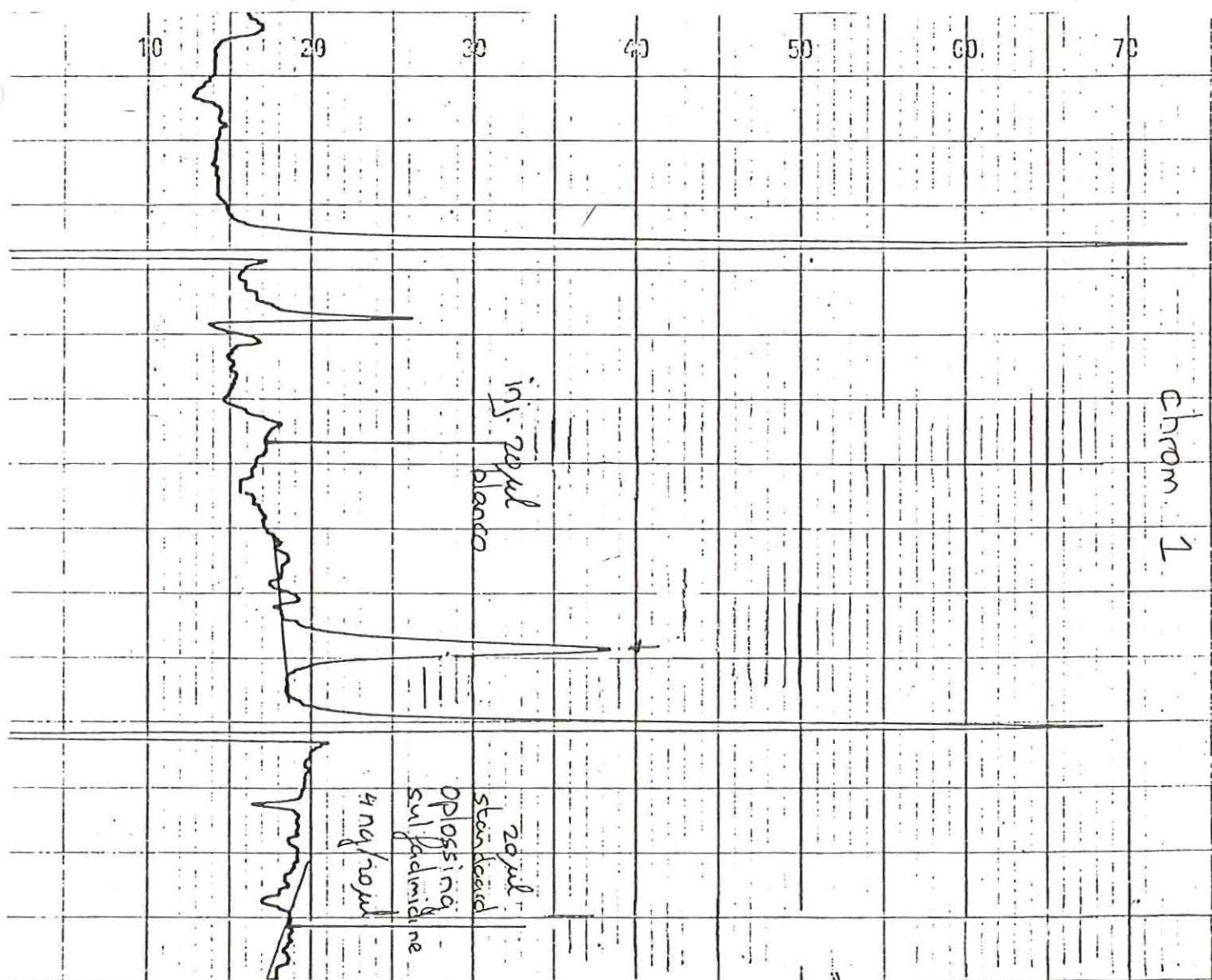
C_s = de concentratie in µg sulfadimidine per ml van de geïnjecteerde standaardoplossing.

Wageningen, 1980-05-19.

Verzendlijst: Van Doesburgh,
Buizer,
Tuinstra,
Traag,
Van Bruchem,
Afdeling Contaminanten,
Circulatie.

W.

Chrom 1



Chrom 2

20 µl blanco
+ toevreezing

oplostia MeOH
+ 2 da HC/6M

sulfadimide

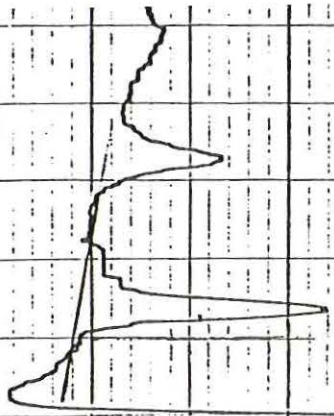
inj. 20 µl
blanco + toe-
vreezing
oplostia MeOH

sulfadimide

003 (V-D-10 001A)

30 40 50 60 70 80

chan 3



inj. 20 µl
monsther 6 plossing
+ tolvocain 9 (500 mg)
+ 2 dr HCL 6N



inj. 20 µl
monstheroplossing
+ 2 dr HCL 6N

